

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10432

研究課題名（和文）ゲノム情報から読み解く薬剤耐性感染症におけるキャリアとしての伴侶動物の重要性

研究課題名（英文）Role of companion animals on cross-species transmission of antimicrobial-resistant bacteria

研究代表者

嶋田 照雅（SHIMADA, Terumasa）

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・教授

研究者番号：00264812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤耐性感染症は伝播という観点から伴侶動物における対策が必須であるが知見が限られている。本研究では伴侶動物、周囲環境、獣医療従事者由来耐性菌（ESBL/AmpC産生腸内細菌科細菌）を用いた全ゲノム比較解析から薬剤耐性菌伝播における伴侶動物の重要性を評価した。その結果、一部の病原性ESBL/AmpC産生大腸菌（ST131/blaCTX-M-27）やbla遺伝子保有プラスミド（IncFII/blaCMY-2など）がヒトと伴侶動物間で伝播し得ることをゲノムレベルで世界で初めて明らかにした。これら成果は耐性菌伝播における伴侶動物の影響の理解につながる重要な新規知見と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、全ゲノム配列情報を基にした宿主間の比較ゲノム解析から、ヒトと伴侶動物間における耐性菌（特にESBL/AmpC産生腸内細菌科細菌）の伝播に関する新規学術知見を創出した。これらは、薬剤耐性感染症の伝播様式の理解に新たな視点を与えた点、今後の薬剤耐性感染症伝播を研究する際の基盤知見となる点において学術的意義がある。一方本研究の社会的意義は、今後の薬剤耐性感染症対策への貢献、すなわち医学領域では薬剤耐性感染症における媒介者としての伴侶動物の重要性の周知活動に向けた基盤知見、ならびに獣医学領域では臨床獣医師への抗菌薬の適切かつ慎重投与の啓発活動の基盤知見を創出した点にある。

研究成果の概要（英文）：Companion animals might be reservoirs for cross-species transmission because of their close contact with humans. However, current knowledge in this field is limited; therefore, the role of companion animals in cross-species transmission remains to be elucidated. Herein, we whole-genome sequenced ESBL/AmpC Enterobacteriaceae from companion animals, environments, and animal health workers and comparison-analyzed them. The results suggest that at least some ESBL/AmpC extraintestinal pathogenic Escherichia coli and bla-coding plasmids can be transmitted between humans and companion animals. Thus, companion animals can act as an important reservoir for ESBL/AmpC Enterobacteriaceae in the community.

研究分野：伴侶動物臨床獣医学

キーワード：薬剤耐性感染症 伴侶動物 伝播 第三世代セファロスポリン耐性腸内細菌科細菌

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて抗菌薬等が効かない薬剤耐性 (AMR) 感染症が拡大しており、世界的な規模の対策が喫緊の課題である。AMR 感染症はヒトに限られた問題ではなく、ワンヘルス (ヒトの健康を守るためには動物や環境への対策も必要であるという概念) の観点から、獣医学領域においても重要である。実際、日本において策定された AMR 対策アクションプランでは、獣医療における薬剤耐性菌の動向調査や抗菌薬の慎重使用の徹底などが取り組むべき課題に含まれており、ヒトでの本感染症に対する予防には動物における対策が必須であることが示されている。獣医療の AMR 感染症対策については、これまで「食品を介した伝播」を中心に議論されてきた経緯があり、主に畜産分野での取り組みが進められてきた。日本では 1999 年から畜産動物由来の細菌を対象に薬剤耐性モニタリングが実施されており、その知見に基づき上記 AMR 対策アクションプランにおいては減少させるべき薬剤耐性菌の種類と目標値が明確に設定されている。その一方でイヌ・ネコを中心とする伴侶動物の薬剤耐性菌に関するサーベイランスやモニタリングは世界的にみても限られており、日本では農林水産省が 2016 年から全国の動物病院を対象に耐性菌のモニタリングを開始したところである。したがって薬剤耐性菌の発生动向、注視すべき菌の種類、宿主間伝播の実態に関する知見は乏しく、具体的な成果目標値の設定には至っていない。しかし伴侶動物は、接触という点においてヒトと最も密接な関係性にあること、耐性菌の報告が近年増加していることから、ヒトとの間で耐性菌の双方向伝播の可能性が懸念されている (図 1)。

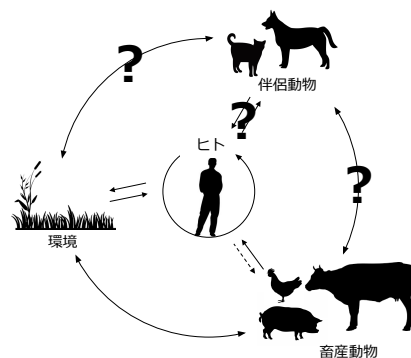


図1 耐性菌の伝播経路と本研究の着眼点

これら現状を踏まえて、研究代表者は伴侶動物の耐性菌保菌や伝播の実態把握ならびにキャリアとしての重要性を評価するために研究を開始した。そして伴侶動物はヒトで注視されている指定耐性菌の 1 つである第三代セファロスポリン耐性 (3GCR) 腸内細菌科細菌 (Ent) を保菌すること、更に全ゲノム配列情報から少なくともその一部はヒトと伴侶動物間で伝播する可能性があることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

研究の対象となった例数が少なく、またヒトを含めた周辺環境の耐性菌調査を行っていないため、正確な評価には至っていない。そこで本研究では、伴侶動物・周辺環境・ヒトから分離された 3GCREnt の全ゲノム情報に基づいた性状解析と宿主間の比較解析を通して学術知見の積み上げを行い、伴侶動物由来 3GCREnt の環境への拡散やヒトへの伝播の可能性をより正確に言及することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 伴侶動物における 3GCREnt の保菌状況調査

研究協力機関である研究代表者所属大学獣医臨床センターに来院した細菌感染症疑いのイヌ・ネコの病巣部と糞便から菌の分離同定と感受性試験を行い耐性菌の種類を決定した。次にパルスフィールドゲル電気泳動法、ゲノムタイピング法を用いて病原性 3GCR が保菌されているか (糞便中に検出されるか) を評価した。病巣からの菌株の分離同定は獣医臨床センターにおける診療過程で外部検査機関に委託した。糞便分与に関しては、動物倫理委員会承認後に同意書を作成し飼い主に対してインフォームドコンセントを行った上で実施した。

### (2) 院内環境における 3GCREnt 分布調査

ヒトへの耐性菌暴露の原因の 1 つと考えられる動物病院施設 (獣医臨床センター) における 3GCREnt のサーベイランスを行った。スワブ検体を選択培地に塗抹し 3GCREnt を分離後、生化学的性状解析によって菌種を同定した。薬剤感受性試験による耐性型別後、パルスフィールドゲル

電気泳動法、ゲノムタイピング法を用いて伴侶動物由来株との近縁性を評価した。

### (3) 獣医療従事者の 3GCREnt 保菌状況調査

ヒト倫理委員会承認後に同意書を作成し、協力者に対してインフォームドコンセントを行った上で実施した。同意の得られた獣医療従事者（獣医臨床センター所属）を対象として糞便の分与を依頼した。分与された糞便を選択培地に塗抹し 3GCREnt を分離後、生化学的性状解析によって菌種を同定した。そして薬剤感受性試験による耐性型別を行った。

### (4) 全ゲノム配列情報に基づいた評価

次世代シーケンサーを用いて、分離された上記菌株の全ゲノムシーケンスを行った。耐性遺伝子を保持する染色体ならびにプラスミドを対象にして、伴侶動物・ヒト・周囲環境間における相同性、耐性遺伝子の周囲環境、病原遺伝子の有無、他の耐性遺伝子の有無を中心に特性を明らかにした。そして伴侶動物由来耐性菌の環境への拡散とヒトへの伝播の可能性について考察を行った。

## 4. 研究成果

2018～2023 年に収集された伴侶動物の病巣または糞便 574 検体、2019～2023 年に収集された動物病院設備スワブ 882 検体、そして 2022 年に提供された獣医療従事者糞便 13 検体を材料とした。それぞれの検体から合計 94 株の 3GCREnt が分離同定された。薬剤感受性試験の結果、基質拡張型  $\beta$  ラクターマーゼ産生菌は 67 株、外来性 AmpC 型  $\beta$  ラクターマーゼ産生菌は 22 株、両方を産生する菌は 5 株であった（表 1）。

動物由来株 48 株、環境由来株 7 株、そしてヒト由来株 7 株の全ゲノムシーケンスを行い、保有 *bla* 遺伝子を確認した（表 2）。動物由来株 1 株は *bla* 遺伝子を確認されなかったため、評価対象から除外した。各菌株における *bla* 遺伝子の所在は染色体上に 17 株（動物由来大腸菌 11 株、動物由来肺炎桿菌 1 株、環境由来 *K. oxytoca* 3 株、ヒト由来大腸菌 1 株、ヒト由来 *E. asburiae* 1 株）、不明は 2 株（動物由来大腸菌 2 株）、プラスミド上に 42 株確認された。菌株のシーケンスタイプは多岐に渡り、動物由来大腸菌では ST10, 38, 68, 131, 162, 297, 372, 405, 457, 648, 998, 1193, 2173, 5995, 11744、動物由来肺炎桿菌では ST15, 107, 307, 392、環境由来 *K. oxytoca* は ST176、環境由来 *E. cloacae* は ST133, 418、ヒト由来大腸菌では ST131, 648, 1193、ヒト由来 *E. asburiae* は ST2265 であり、動物由来大腸菌からヒトの腸管外病原性大腸菌である ST68、ST131、ST405、ST998 などが検出された。

宿主間での菌株またはプラスミドの伝播の可能性を評価するため、本研究にて配列が決定されたプラスミド同士の近縁性の評価を行った。IncFIA-FIB/*bla*CTX-M-27 型プラスミドはヒトとイヌの大腸菌から検出されたが、その相同性は塩基一致率 51%、カバー率 51%と低かった。他のプラスミド型/*bla* 遺伝子型は動物・環境・ヒト間で一致するものは確認されなかった。一方、異なる伴侶動物から相同性の高い（塩基一致 97%、カ

表 1 本研究で用いた材料

Origin	Year	Number of samples	Number of 3GCREnt	Bacterial species and beta-lactamase type	
Dogs and cats	2018 to 2023	574 (Infection site, 552; feces, 22)	74	<i>Escherichia coli</i>	63
				ESBL	40
				AmpC	20
				Both	3
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
				ESBL	11
Environment	2019 to 2023	882	13	<i>Enterobacter cloacae</i>	8
				ESBL	5
				AmpC	2
				Both	1
				<i>Klebsiella oxytoca</i>	5
				ESBL	4
Human	2022	13	7	<i>Escherichia coli</i>	6
				ESBL	6
				<i>Enterobacter asburiae</i>	1
				ESBL	1

表 2 *bla* 遺伝子型

Number of bacterial strain	Dogs and cats		Environments		Humans	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. asburiae</i>
CMY-2	15	0	0	0	0	0
CTX-M-3	0	1	0	0	0	0
CTX-M-9	0	0	1	0	0	0
CTX-M-14	6	0	0	0	1	0
CTX-M-15	6	9	3	0	0	0
CTX-M-27	10	0	0	0	3	0
CTX-M-55	0	0	0	0	2	0
OXA-1	1	0	3	0	0	0
MIR-3	0	0	0	0	0	1
OXY-2-5	0	0	0	3	0	0
SHV-2	0	1	0	0	0	0
SHV-12	1	0	1	0	0	0

バー率 98%) IncFII/*bla*CMY-2 や IncI $\gamma$ /*bla*CMY-2 型プラスミドが検出された。これらの結果から当該施設において動物から環境への拡散やヒトとの伝播を示す証拠は得られなかった。しかし一部のプラスミドは伴侶動物において伝播する可能性が示された。

次に公共データベースに登録されたプラスミド配列を用いて、本研究で配列が決定されたプラスミドとの相同性比較を行った。ヒト由来大腸菌の IncII/*bla*CTX-M-55 プラスミドは 2000 年代に中国の豚や鶏から分離された大腸菌のプラスミドと相同性が高かった (塩基一致率 95%、カバー率 97%)。更にヒトのサルモネラ菌や赤痢菌、肺炎桿菌由来プラスミドとも高い相同性を示した。一方で伴侶動物由来プラスミドとの近縁性は最も高いものでも塩基一致率 88%、カバー率 94%であり、上記のものと比較して低かった。これら結果は①本プラスミドはヒトと鶏や豚など畜産動物間で伝播するが、伴侶動物とは伝播しない、または②公共データベースに登録されている伴侶動物の配列データが限られており正確に評価できない、の2つの可能性を示している。

環境由来 *E. cloacae* の IncHI2/*bla*CTX-M-15/*bla*OXA-1 プラスミドはヒトやイヌ由来大腸菌のプラスミドと相同性が高かった (塩基一致率 99.99%、カバー率 94%)。伴侶動物由来 IncIgamma/*bla*CMY-2, IncI1/*bla*CMY-2, IncFIB/*bla*CTX-M-15, IncI1/*bla*CTX-M-15, IncBOKZ/*bla*CTX-M-14, IncFIA-FIB-FII/*bla*CTX-M-27はヒトから分離された大腸菌やサルモネラ菌、赤痢菌、肺炎桿菌のプラスミドと相同性が高かった (いずれも塩基一致率 95%以上、カバー率 95%以上) (図2)。したがってこれらプラスミドは菌種を超えて水平伝播し、更に伴侶動物とヒトとの間で伝播する可能性を有している。

次に複数の伴侶動物から分離された ST131 型大腸菌に注目した。本型菌はヒトの腸管外病原性大腸菌として知られている。イヌ由来株 4 株と公共データベースに登録されている複数のヒト由来同型菌を用いて染色体系統樹を作成し、SNP 解析を行った。イヌ由来株はそれらのみで独立した系統を作ることなく、ヒト由来株と混在することが確認された。更に SNP マトリクスからイヌ由来株同士 (検体番号 048F, 026F2, 056S) が最近縁ではなく、ヒト由来株 (str81009) がそれぞれの最近縁であることが明らかとなった。以上の結果から上記イヌ由来の3株はヒトから入った後にそれぞれ独立して進化したと考えられた。

また全ゲノム解析において伴侶動物由来大腸菌 2 株は *bla* 遺伝子に加えて可動性コリスチン耐性 *mcr* 遺伝子をプラスミド上に保有することが明らかとなった。本特徴を有したプラスミドを保有する菌は第三世代セファ

図2 本研究で分離されたイヌ由来プラスミドと公共データベースのヒト由来プラスミドの近縁性評価 (IncFIB/*bla*CTX-M-15)

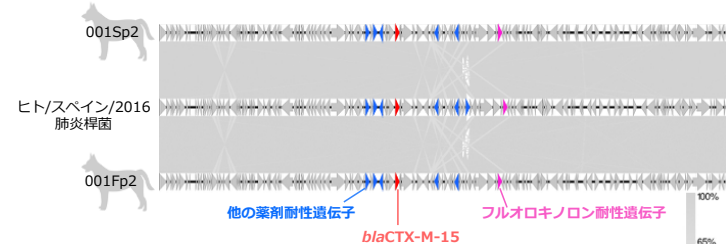


図3 ST131 型大腸菌の系統樹解析

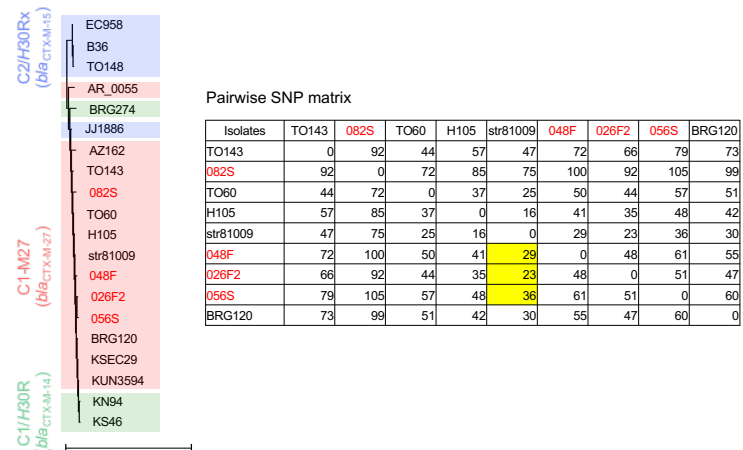
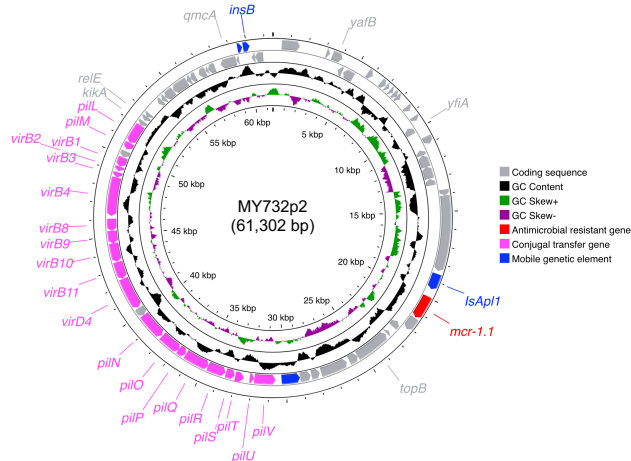


図4 イヌ由来 *mcr-1* 保有プラスミド



ロスポリン系抗生物質に加えてコリスチンにも耐性を示し、現在ヒトにおいて世界的に問題となっている。イヌから分離された大腸菌は、①コリスチンに耐性であること、②*mcr* 遺伝子と *bla*CTX 遺伝子は別々のプラスミドに存在すること、③両方のプラスミドが同時に水平伝播して感受性株を両方の抗生物質に対する耐性株に変化させること、が明らかとなった。また、ネコから分離された大腸菌 1 株は、①*mcr* 遺伝子を持っているがコリスチンに耐性ではないこと、②*mcr* 遺伝子の発現に必要とされる遺伝子を欠いていること、③*mcr* 遺伝子と *bla*CTX 遺伝子は同じプラスミド上に存在すること、④このプラスミドが水平伝播することで感受性株は第三世代セファロスポリン耐性株へ変化すること、が明らかとなった。

3GCREnt の伴侶動物とヒトとの伝播に関して、全ゲノム情報を元に解析した研究は世界でも未だ限られている。本研究を通して耐性菌伝播における伴侶動物の影響の理解につながる重要な新規知見が創出された。今後研究を継続発展させることで医学、獣医学、公衆衛生学分野の AMR 感染症対策への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasugi M, Hatoya S, Motooka D, Kondo D, Akiyoshi H, Horie M, Nakamura S, Shimada T	4. 巻 280
2. 論文標題 Genetic and phenotypic analyses of mcr-harboring extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from companion dogs and cats in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Microbiology	6. 最初と最後の頁 109695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetmic.2023.109695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasugi M, Hatoya S, Motooka D, Matsumoto Y, Shimamura S, Tani H, Furuya M, Mie K, Miyake M, Nakamura S, Shimada T	4. 巻 16
2. 論文標題 Whole-genome analyses of extended-spectrum or AmpC -lactamase-producing Escherichia coli isolates from companion dogs in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0246482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0246482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安木真世
2. 発表標題 犬由来第三世代セファロスポリン耐性大腸菌の全ゲノム解析と人との宿主間伝播の可能性の評価
3. 学会等名 日本感染症学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪公立大学獣医学部附属獣医臨床センター  
<https://www.omu.ac.jp/vet/vmc/>  
大阪府立大学生命環境科学域附属 獣医臨床センター  
<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/hospital/>  
大阪府立大学生命環境科学域附属 獣医臨床センター  
<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/hospital/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	安木 真世  (YASUGI Mayo)  (40589008)	大阪公立大学・大学院獣医学研究科 准教授   (24405)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------